

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 20520080150201

UDC_____

厦门大学

博士学位论文

纳米仿生膜的构建及其电学和力学性质
研究

Construction of Nano-BLMs and Their Electrical and
Mechanical Properties Research

朱在稳

指导教师姓名: 毛秉伟 教授

专业名称: 物理化学

论文提交日期: 2013 年 7 月

论文答辩日期: 2013 年 8 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 8 月

Construction of Nano-BLMs and Their Electrical and Mechanical Properties Research

A Dissertation Submitted for the Degree of Doctor of Science

By

Zai-wen Zhu

Supervised by

Prof. Bing-Wei Mao

Department of Chemistry

Xiamen University

August, 2013

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录	
摘 要.....	I
Abstract	VI
第一章 绪论.....	1
§ 1.1 人工仿生生物膜体系.....	2
§ 1.1.1 非支撑平板磷脂双层膜 (BLMs)	2
§ 1.1.2 介质支撑平板磷脂双层膜 (s-BLMs)	3
§ 1.1.3 脂质体 (liposome)	6
§ 1.1.4 三种人工仿生生物膜体系的比较.....	8
§ 1.2 固体纳米孔制备方法.....	9
§ 1.2.1 硅基纳米孔.....	9
§ 1.2.2 有机聚合物纳米孔.....	13
§ 1.2.3 氧化铝纳米孔.....	14
§ 1.2.4 玻璃纳米孔.....	15
§ 1.3 非支撑平板磷脂双层膜的构建和性质研究.....	17
§ 1.3.1 BLMs 的构建方法	17
§ 1.3.2 BLMs 的研究现状	19
§ 1.4 功能化非支撑平板磷脂双层膜的研究进展.....	22
§ 1.4.1 功能化 BLMs 的构建方法.....	22
§ 1.4.2 功能化 BLMs 在生命科学中的应用.....	24
§ 1.5 本论文的研究目的及设想.....	32
参考文献.....	34
第二章 实验.....	57
§ 2.1 各类实验主要试剂.....	57

§ 2.1.1 MEMS 微加工主要试剂.....	57
§ 2.1.2 玻璃纳米孔制备主要试剂.....	58
§ 2.1.3 电化学实验主要试剂.....	59
§ 2.1.4 荚膜红细菌培养主要试剂.....	60
§ 2.2 实验仪器和装置.....	61
§ 2.2.1 MEMS 微加工实验仪器.....	61
§ 2.2.2 电化学实验仪器与方法.....	62
§ 2.2.3 电极和电解池装置.....	65
§ 2.3 原子力显微镜.....	68
§ 2.3.1 原子力显微镜的工作原理.....	69
§ 2.3.2 原子力显微镜的工作模式.....	69
§ 2.4 其它主要仪器.....	71
参考文献.....	72
第三章 悬浮氮化硅纳米多孔膜芯片的制备.....	75
§ 3.1 体硅的前期腐蚀.....	76
§ 3.1.1 硅片的前期准备.....	76
§ 3.1.2 光刻和 ICP 刻蚀.....	80
§ 3.1.3 体硅的各向异性腐蚀.....	85
§ 3.2 基于胶体微球刻蚀技术制备硅基纳米孔.....	88
§ 3.2.1 PS 球单分散组装和 Cr 掩膜制备.....	89
§ 3.2.2 ICP 刻蚀制备 Si_3N_4 纳米孔.....	92
§ 3.3 体硅腐蚀制备悬浮氮化硅纳米多孔膜.....	93
§ 3.3.1 腐蚀剩余体硅和 SiO_2 层.....	94
§ 3.3.2 悬浮的氮化硅纳米多孔膜芯片的表征.....	95
本章小结.....	98
参考文献.....	99
第四章 硅基纳米孔上非支撑平板磷脂双层膜的构建及其性质研究	

.....	104
§ 4.1 硅基纳米孔上 Nano-BLMs 的构建	105
§ 4.1.1 氮化硅表面的氟硅烷修饰	105
§ 4.1.2 氮化硅纳米多孔膜上 Nano-BLMs 的构建	110
§ 4.2 硅基纳米孔上 Nano-BLMs 的电学特性研究	111
§ 4.2.1 Nano-BLMs 的电学特性研究	112
§ 4.2.2 孔径尺寸对 Nano-BLMs 膜寿命的影响	116
§ 4.3 硅基纳米孔上 Nano-BLMs 的机械稳定性研究	118
§ 4.3.1 Nano-BLMs 的 AFM 表征	119
§ 4.3.2 Nano-BLMs 的机械稳定性研究	121
§ 4.4 硅基纳米孔上功能化 Nano-BLMs 的研究	126
本章小结	130
参考文献	132
第五章 玻璃纳米孔上非支撑平板磷脂双层膜的构建及离子通道电流检测	138
§ 5.1 玻璃纳米孔的制备及孔上 BLMs 的构建	139
§ 5.1.1 玻璃纳米孔的制备	139
§ 5.1.2 玻璃纳米孔上 BLMs 的构建	146
§ 5.1.3 玻璃纳米孔上 BLMs 的稳定性研究	148
§ 5.2 压力驱动法构建 α-HL 和短杆菌肽蛋白功能化 BLMs 及离子通道电流检测	150
§ 5.2.1 α -HL 离子通道电流的检测	151
§ 5.2.2 短杆菌肽离子通道电流的检测	152
§ 5.3 囊泡融合法构建 H^+-ATPase 功能化 BLMs 及通道电流检测	154
本章小结	166

参考文献	168
第六章 纳米厚度悬浮钯膜芯片制备及串联双室电解池溶液 pH 调控	
.....	174
§ 6.1 常见 pH 调控方法	174
§ 6.1.1 溶液型 pH 值调控法	175
§ 6.1.2 两性电解质空间的 pH 值调控法	176
§ 6.1.3 电化学 pH 值调控法	177
§ 6.2 纳米级厚度的悬浮钯膜芯片的制备	181
§ 6.2.1 悬浮钯膜芯片的制备流程	181
§ 6.2.2 悬浮钯膜芯片的表征	182
§ 6.2.3 钯膜芯片的电化学行为研究	184
§ 6.3 基于钯膜芯片串联电解池的电化学溶液 pH 调控平台的搭建	189
§ 6.3.1 Pd-H pH 指示电极的制备	189
§ 6.3.2 钯膜芯片串联电解池中溶液 pH 循环调控	190
§ 6.3.3 溶液 pH 控调控效率研究	196
§ 6.3.4 双耦合 Ag 纳米粒子暗场初步实验	198
本章小结	202
参考文献	204
在学期间发表的论文	210
致 谢	212

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English.....	VI
Chapter 1 Introduction.....	1
§ 1. 1 Artificial biomimetic membrane system	2
§ 1. 1. 1 Free-standing bilayer lipid membranes (BLMs)	2
§ 1. 1. 2 Supported bilayer lipid membranes (s-BLMs)	3
§ 1. 1. 3 Liposome	6
§ 1. 1. 4 Comparison of the three types of artificial biomimetic membrane system	8
§ 1. 2 Methods for the fabrication of solid-state nanopores.....	9
§ 1. 2. 1 Silicon nanopores.....	9
§ 1. 2. 2 Organic polymer nanopores.....	13
§ 1. 2. 3 Nanoporous alumina	14
§ 1. 2. 4 Glass nanopores.....	15
§ 1. 3 Formation of BLMs and their properties research.....	17
§ 1. 3. 1 Methods for the construction of BLMs	17
§ 1. 3. 2 Research status of BLMs.....	19
§ 1. 4 Development of functional BLMs.....	22
§ 1. 4. 1 Methods for the construction of functional BLMs	22
§ 1. 4. 2 Application of functional BLMs in life science.....	24
§ 1. 5 Objectives and main contents of this thesis.....	32
References.....	34
Chapter 2 Experimental.....	57

§ 2.1 Reagents	57
§ 2.1.1 Reagents for MEMS micro-fabrication	57
§ 2.1.2 Reagents for fabricating glass nanopores	58
§ 2.1.3 Reagents for electrochemical experiments	59
§ 2.1.4 Reagents for rhodobacter capsulatus culture	60
§ 2.2 Instruments and devices	61
§ 2.2.1 Instruments for MEMS micro-fabrication	61
§ 2.2.2 Electrochemical instruments and methods	62
§ 2.2.3 Electrodes and Electrolytic cells	65
§ 2.3 Atomic Force Microscopy (AFM)	68
§ 2.3.1 Working principle of AFM	69
§ 2.3.2 Operation modes of AFM	69
§ 2.4 Other main instruments	71
References	72
Chapter 3 Fabrication of suspended nanoporous silicon nitride membranes	75
§ 3.1 Pre-etching of Si wafers	76
§ 3.1.1 Pre-treatment of Si wafers	76
§ 3.1.2 Photolithography and ICP etching	80
§ 3.1.3 Anisotropic etching of bulk silicon	85
§ 3.2 Colloidal lithography-based fabrication of nanoporous silicon nitride	88
§ 3.2.1 Monodispersed self-assembly of PS nanoparticles and preparation of Cr mask	89
§ 3.2.2 Fabrication of nanoporous silicon nitride by ICP etching	92
§ 3.3 Fabrication of suspended nanoporous silicon nitride membranes by Silicon etching	93

§ 3. 3. 1 Etching of the remaining part of silicon and removal of SiO_2	94
§ 3. 3. 2 Characterization of suspended nanoporous silicon nitride membrane chips	95
Summary	98
References	99
 Chapter 4 Construction of BLMs on silicon nanopores and property study	 104
§ 4. 1 Construction of nano-BLMs on silicon nanopores	105
§ 4. 1. 1 Hydrophobic silanization of silicon nanopores	105
§ 4. 1. 2 Formation of nano-BLMs on nanoporous silicon nitride membranes	110
§ 4. 2 Electrical property study of nano-BLMs suspended on silicon nanopores	111
§ 4. 2. 1 Investigation of the electrical properties of nano-BLMs	112
§ 4. 2. 2 Influence of pore size on the lifetime of nano-BLMs	116
§ 4. 3 Mechanical stability study of nano-BLMs suspended on silicon nanopores	118
§ 4. 3. 1 Characterization of nano-BLMs by two-chamber AFM	119
§ 4. 3. 2 Investigation of the mechanical stability of nano-BLMs	121
§ 4. 4 Investigation of functional nano-BLMs suspending on silicon nanopores	126
Summary	130
References	132
 Chapter 5 Construction of BLMs on glass nanopores and ion channel recordings	 138
§ 5. 1 Fabrication of glass nanopores and formation of BLMs	139
§ 5. 1. 1 Fabrication of glass nanopores	139
§ 5. 1. 2 Construction of BLMs on glass nanopores	146

§ 5. 1. 3 Investigation of the stability of BLMs on glass nanopores	148
§ 5. 2 Construction and ion channel recordings of functional BLMs with α-HL and gramicidin by pressure method	150
§ 5. 2. 1 Ion channel recordings of α -HL	151
§ 5. 2. 2 Ion channel recordings of gramicidin	152
§ 5. 3 Construction and ion channel recordings of functional BLMs with H^+-ATPase by vesicle fusion method	154
Summary.	166
References.	168
Chapter 6 Fabrication of free-standing nanoscale-thick Pd film chips and solution pH control based on a serial electrolytic cell	174
§ 6. 1 Common methods for pH control.	174
§ 6. 1. 1 Solution method for pH control	175
§ 6. 1. 2 Spatial modulation of pH by ampholyte	176
§ 6. 1. 3 Electrochemical method for pH control.	177
§ 6. 2 Fabrication of free-standing nanoscale-thick Pd films chip.	181
§ 6. 2. 1 Fabrication procedures of free-standing nanoscale-thick Pd film chips	181
§ 6. 2. 2 Characterization of free-standing nanoscale-thick Pd films chip . . .	182
§ 6. 2. 3 Investigation of the electrochemical properties of free-standing nanoscale-thick Pd film chips	184
§ 6. 3 Construction of electrochemical solution pH control platform based on a serial electrolytic cell involving Pd film chip.	189
§ 6. 3. 1 Preparation of Pd-H pH indicator electrode.	189
§ 6. 3. 2 Solution pH cycling based on a serial electrolytic cell	190
§ 6. 3. 3 Investigation of solution pH cycling efficiency.	196
§ 6. 3. 4 Preliminary dark-field experiment of pH driven dissociation of Ag nanoparticle dimers	198

Summary	202
References	204
Publication during Ph.D. study	210
Acknowledgements	212

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

细胞膜是由脂类、蛋白质以及糖类组成的超分子体系，它与众多生命现象密切相关。细胞膜的组成复杂且各成分存在复杂的相互联系，较难对其进行直接研究。类脂双层膜作为一种最接近生物膜的动态自组装双层分子膜，具有与细胞膜骨架类似的结构，同时避开了天然细胞膜的复杂性，因而被广泛用于仿生生物膜研究。在仿生生物膜研究中，如何有效地提高磷脂双层膜的稳定性而又不改变磷脂双层膜的基本特性，是科学家们一直努力的方向。基于此，本论文主要围绕仿生生物膜研究中的两个重要问题而展开：一是如何构建具有高稳定性和长寿命的非支撑磷脂双层膜（BLMs）；二是如何建立和发展在接近生理环境的条件下对非支撑双层膜结构与功能的原位研究平台。

本论文首先基于微纳米加工技术发展用于制备硅基纳米多孔膜的方法，探索在其上构建（功能化）纳米尺度非支撑磷脂双层膜（nano-BLMs），结合电化学技术并发展两室原子力显微镜（AFM）方法，对磷脂双层膜的电学和力学特性进行研究；其次，改进现有“bench-top”方法制备玻璃纳米孔的方法，并利用电化学技术对孔上构建的功能化磷脂双层膜中的通道蛋白的性质进行研究。最后，构建基于硅基钽膜芯片的电化学溶液 pH 调控体系，为实时研究溶液 pH 对通道蛋白性质的影响及发展基于溶液 pH 的化学和生物传感的应用提供平台。主要研究内容和成果如下：

(1) 发展胶体微球刻蚀-MEMS 技术，成功制备了不同孔径的悬浮氮化硅纳米多孔膜芯片。该技术主要利用荷电聚苯乙烯球（PS）的单分散自组装并结合蒸镀 Cr 层作为掩模层，然后通过电感耦合等离子体（ICP）刻蚀得到氮化硅纳米洞，最后运用微机电系统（MEMS）技术刻蚀硅体，获得硅基悬浮氮化硅纳米多孔膜芯片。该技术具有较高的可行性和普适性，可通过改变组装的 PS 球的大小或者蒸镀的 Cr 层的厚度，有效地改变纳米孔径（100~700 nm），实现大面积、单分散且具有较低纵横比的纳米孔芯片的制备。此外，相对于昂贵的电子束或离子束刻蚀纳米孔技术，该技术具有低耗费、效率高的特点和优势。

(2) 硅基纳米孔芯片上构建纳米尺度（功能化）非支撑磷脂双层膜，运用电化学技术并发展两室 AFM 方法，对磷脂双层膜的电学和力学特性进行研究。首先，

对直径为 200、400 和 700 nm、厚度为 200 nm 的硅基悬浮氮化硅纳米多孔膜芯片进行疏水性修饰, 采用涂抹法在纳米孔芯片上构建 nano-BLMs, 并通过电化学阻抗谱 (EIS) 对磷脂膜的电学特性及孔径对膜寿命的影响进行研究。结合磷脂的荷电特性, 我们提出了含“磷脂-溶液界面双电层”的新等效电路, 可以很好地拟合 EIS 数据并可获得不同孔径的 nano-BLMs 的最初膜电阻和平均比电容分别为 38.8-53.6 G Ω 和 $C'_{m-SiN} = 5.9 \mu F cm^{-2}$ 。此外, 不同孔径的 nano-BLMs 随时间变化的 EIS 数据拟合结果表明, 200、400 和 700 nm nano-BLMs 膜寿命分别至少为: 144、122 和 24 h, 说明膜寿命随孔径的减小而增加; 其次, 构建两室 AFM 研究平台, 在接近生理环境的溶液中, 利用 AFM 特有的定位技术对 nano-BLMs 进行力曲线研究。结果表明, 磷脂膜膜破力、表观力常数和侧向张力都随孔径的减小而增加, 这说明了孔径越小, 磷脂膜受机械干扰能力越强, 稳定性越高, 该结果与 EIS 实验结果一致。最后, 利用一步涂抹蛋白磷脂法, 成功地实现功能化磷脂膜的快速构建, 并利用 EIS 对其随时间变化进行研究。研究发现, 功能化磷脂膜的寿命远远小于非功能化磷脂膜的寿命, 这可能是由于蛋白的活动使得磷脂膜的有序性变差而导致膜的稳定性变差, 并逐渐出现破裂使得离子容易穿透磷脂膜。

(3) 改进现有“bench-top”方法制备玻璃纳米孔并在孔上构建功能化的非支撑磷脂双层膜, 并利用电化学技术实现对蛋白的单通道电流及性质进行检测和研究。相比于早前的报道, 本文采用钨丝和厚壁玻璃管来制备纳米孔, 可避免剧毒物质氰化物的使用, 同时提高玻璃纳米孔的制备成功率; 其次, 利用涂抹法在玻璃纳米孔上构建的 BLMs 并利用电化学对其性质进行研究。研究结果表明, 构建的 BLMs 具高的膜电阻 (高达 75.8 G Ω) 和长的膜寿命 (至少 40 天); 最后, 在压力系统条件下, 实现对 α -HL 和短杆菌肽蛋白的单通道电流检测。同时, 利用脂质体囊泡融合到平板磷脂膜的方法, 在不存在压力系统的条件下, 将含 H^+ -ATPase 的载色体囊泡融合到磷脂双层膜, 通过改变相关参数并利用电化学技术对其质子通道性质进行研究。研究结果表明: 第一, 融合具有一定的方向性, H^+ -ATPase 的 F_o 部分朝管外、 F_1 部分朝管内。第二, 质子通道对跨膜电压存在依赖性, 其通道信号开放几率随着跨膜电压的增加而迅速提高, 这暗示着提高跨膜电压将会有利于 H^+ -ATPase 在体外进行的 ATP 合成。第三, 质子通道对质子浓度梯度存在依赖性, 其通道信号开放几

率随着管外 (F_o 侧, trans) 溶液 pH 值的增加而降低, 这也暗示着在保障酶活性的前提下, 适当地降低 F_o 侧溶液 pH 值将会有利于 H^+ -ATPase 在体外进行的 ATP 合成。

(4) 设计并搭建了基于钯膜芯片的立式串联双室电解池的电化学溶液 pH 调控平台, 该平台可在不改变体积、不需要添加额外物质、不产生氢气和氧气的情况下, 进行高效、快速、实时的溶液 pH 循环调控。利用电化学技术并结合 Pd-H pH 指示电极, 实现了溶液 pH 值在 3.4-10.5 范围内的循环变化和实时检测; 利用电化学并结合酸碱荧光指示剂, 实现了溶液 pH 调变过程中的实时荧光成像。相比于本组前期使用的 25 μm 商业化钯膜, 氢原子通过 200 nm 厚度的悬浮钯膜芯片所需的时间至少缩短 100 倍。总之, 理论估算和实验结果皆表明, 200 nm 厚度的悬浮钯膜芯片具有透氢速率高的特点, 可使得 H^+ 很快地从串联双室电解池中的一室到达另一室, 实现溶液 pH 的快速调节。

关键词: 原子力显微镜 (AFM); 悬浮氮化硅纳米多孔膜; 纳米尺度非支撑磷脂双层膜 (nano-BLMs); 玻璃纳米孔; 离子通道蛋白

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库